

# きのこへの $\gamma$ 線照射\*

(第1報)ヌクレオチドの変化と核酸分解酵素系の安定性

毛利 威徳・秦 圭子・寺田 潤子・橋田 度

## $\gamma$ -Irradiation to Mushrooms

### (I) Effect of $\gamma$ -Irradiation on the Stability and Activity of Nucleic Acid Related Substances and Enzymes in Mushrooms

Takenori Mouri, Keiko Hata, Junko Terada and Wataru Hashida

Mushrooms (*Psalliota bisporus*) and Shii-take (*Lentinus edodes*) were irradiated with  $r$ -rays of 5 to  $50 \times 10^5$  rad, and changes of nucleic acid related substances were investigated by means of chromatography with a Dowex 1 $\times$ 8 column. ATP in mushrooms and Shii-take disappeared at a dose of  $5 \times 10^6$  rad, whereas ADP remained as much as the initial amounts (Figs. 1 and 2, Tables 1 and 2). Changes in the amounts of mononucleotides were negligible.

Preliminary experiments were carried out on the extractability of nucleic acid related enzymes from mushrooms. Extracted enzyme solutions from mushrooms were subjected to  $r$ -irradiation, as a result, their ribonuclease, phosphodiesterase and phosphomonoesterase activities remained moderate even at a high dose of  $5 \times 10^6$  rad (Figs. 3 and 4).

It seems reasonable to consider that there is a possibility of the breakdown of nucleic acid related substances during the storage by the actions of the enzymes that have remained after the  $r$ -irradiation.

## 緒 言

食品の生原料に対し、 $r$ 線を照射する場合には、殺菌と共に原料自体の生理作用を抑え、保貯性を伸長する効果があるが、同時に食品成分に対して副作用があり、品質を劣化させる短所もある。マッシュルームでは veil が破れるのを遅らせ、保貯性が高められた<sup>1,2)</sup>が、一方着色の増加、照射臭の生成など欠点も見出されている。

ヌクレオチドはきのこの重要な呈味成分である<sup>3~5)</sup>が、加工操作においても特異的な消長を示すこと<sup>6~11)</sup>がみとめられている。本報では生のマッシュルーム、シイタケの $r$ 線照射によって、含有されるヌクレオチドがどんな影響を受けるかをしらべた。またヌクレオチドの消長の原因として、核酸成分の放射線による変化<sup>12~16)</sup>のほかに、照射に耐えて核酸分解酵素系が残存する場合に、その後の貯蔵期間に作用することも考えられるので、本報ではそれら酵素系の安定性についてもしらべた。

\* 醸酵工学49巻8号(1971)所載

## 実 験 方 法

1.  $\gamma$ 線照射設備 住友化学工業株式会社宝塚研究所に照射を依頼した。Co<sup>60</sup>線源は約5,000キュリー、線量率は $3.6 \times 10^5$ R/hrであった。

2. 試料の調製 きのことしては、当短期大学栽培のマッシュルーム (*Psalliota bisporus*) と市販品のシイタケを使用した。

未照射対照あるいは照射したきのこは中島ら<sup>4)</sup>の記載に準じて、冷時過塩素酸で抽出し、抽出液は核酸成分分析用の試料とした。

また核酸分解酵素の活性を測定するために、きのこ可食部分あるいは特定区分を5倍量の蒸溜水とともにホモジナイズし、冷却遠心分離機により12,000rpmで遠心し、その上澄液を粗酵素液とした。

3. 分析方法 個々のヌクレオチドは中島ら<sup>4)</sup>の記載に準じ、Dowex 1  $\times$  8 蟻酸型のカラムで、蟻酸-蟻酸ソーダを展開液として定量した。

対照の標準物質として、塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチド類は市販品を使用した。

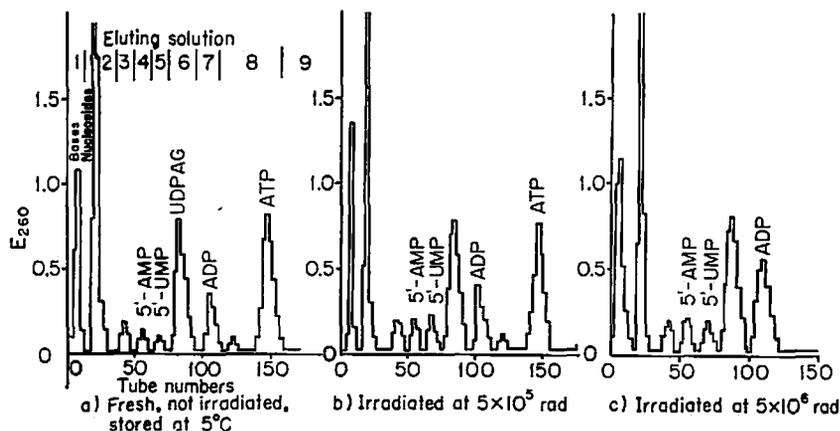
蛋白質はFolin-Ciocalteu<sup>17)</sup>の呈色法、または280m $\mu$ の吸収によって定量し、磷酸はFiske-Subbarow法<sup>18)</sup>によった。

粗酵素液のRNase, PDase, PMase活性は須原、大村の記載<sup>19)</sup>に準じて測定した。

## 実 験 結 果

### 1. $\gamma$ 線照射によるマッシュルーム、シイタケ核酸成分の変化

収穫直後のマッシュルームに $5 \times 10^5$  radおよび $5 \times 10^6$  radの $\gamma$ 線を照射したものと、照射と同時間、未照射のまま5°Cの冷蔵庫内あるいは室温に貯蔵した対照と、計4種の試料について、核酸成分の変化をカラムクロマトグラフィでしらべたところ、その典型的なクロマトグラムはFig. 1



a) Fresh, not irradiated, stored at 5°C. b) Irradiated at  $5 \times 10^5$  rad. c) Irradiated at  $5 \times 10^6$  rad.

Fig. 1. Chromatograms of nucleotides of  $\gamma$ -ray-irradiated mushrooms. (10ml-fractions)

Table 1. Nucleotides in  $\gamma$ -ray irradiated-mushrooms.

Samples		Frac. B*	Frac. C	5'-AMP	5'-UMP	UDPAG	ADP	ATP
Not irradiated, stored at 5°C	UV 260**	95.77	6.94	5.31	4.50	48.61	24.65	32.88
	$\mu$ mole/g dry wt.			0.82	0.95		3.56	4.93
Not irradiated, stored at room temp.	UV 260	98.88	6.24	6.03	3.75	40.38	17.23	32.82
	$\mu$ mole/g dry wt.			0.92	0.82		2.73	5.20
Irradiated at $5 \times 10^5$ rad	UV 260	112.74	trace	3.51	6.37	46.75	25.54	27.53
	$\mu$ mole/g dry wt.			0.41	1.36		3.83	4.58
Irradiated at $5 \times 10^6$ rad	UV 260	61.97	trace	8.28	7.97	43.78	30.01	trace
	$\mu$ mole/g dry wt.			1.23	1.64		4.52	

\* Fraction from chromatography, including nucleosides and bases.

\*\* Absorbancy at 260  $m\mu$  of each fraction.Table 2. Nucleotides of  $\gamma$ -ray irradiated Shii-take.

Samples		Frac. B*	Frac. C	5'-AMP	5'-UMP	5'-GMP	ADP	ATP
Not irradiated, stored at 5°C	UV 260**	7.48	26.18	2.13	5.78	4.95	38.87	22.08
	$\mu$ mole/g dry wt.			0.30	1.02	0.71	4.89	2.75
Not irradiated, stored at room temp.	UV 260	7.51	31.62	2.08	2.18	5.04	25.68	9.52
	$\mu$ mole/g dry wt.			0.30	0.40	0.82	3.67	1.32
Irradiated at $5 \times 10^5$ rad	UV 260	9.88	40.24	4.55	1.26	9.70	36.16	trace
	$\mu$ mole/g dry wt.			0.43	0.17	1.22	3.94	
Irradiated at $5 \times 10^6$ rad	UV 260	43.65	19.52	4.80	5.98	14.28	36.16	trace
	$\mu$ mole/g dry wt.			0.51	1.02	2.14	4.48	

\* Fraction including nucleosides and bases.

\*\* Absorbancy at 260  $m\mu$  of each fraction.

のようである。各ピークの 260 $m\mu$  における吸光値より、それぞれのヌクレオチド量を計算したところ Table 1 のようであった。

$5 \times 10^5$  rad 照射区の ATP, ADP 量を冷蔵区、室温貯蔵区の未照射対照と比べると、あまり変化がなく、5'-AMP, 5'-UMP 量にはわずかな消長はあったが、呈味性に影響するとは考えられない。マッシュルームでは、副作用を避けるための限界線量は  $5 \times 10^5$  rad 付近であると考えられている<sup>1,2)</sup>が、この結果からこの線量ではヌクレオチドの呈味性に対する影響はほとんどないといえよう。

$5 \times 10^6$  rad 照射区では ATP は痕跡量まで減少し、ADP と 5'-ヌクレオチドは少し増加した。この線量は街詰の完全殺菌のために必要なものであるが、ヌクレオチド量にも影響することがみとめられた。

生シタケにマッシュルームと同様の区分で  $\gamma$ 線を照射した結果は Table 2 に示すようである。この場合は未照射対照の室温区でも ATP の減少がみとめられた。ATP はシタケ子実体内では不安定で、室温貯蔵中にも生理作用によって変化するのであろうと考えられる。

$\gamma$ 線を照射した  $5 \times 10^5$  rad 区、 $5 \times 10^6$  rad 区では ATP は何れも痕跡量となったが、ADP,

AMP は見掛け上あまり増減がなかった。

このようなヌクレオチドの変化の原因として  $\gamma$  線照射による核酸成分の分解がまず考えられる。  $5 \times 10^5$  rad から  $5 \times 10^6$  rad に線量をあげると、ヌクレオチドの変化が著しくなった。つぎに、 $\gamma$  線照射に際して残存した酵素系が作用することを考えねばならないので、以下  $\gamma$  線照射における核酸分解酵素系の安定性について検討した。

## 2. 粗酵素抽出法の吟味

きのこの子実体より核酸分解酵素系を抽出する方法として、マッシュルーム、シイタケを対象とし、どんな抽出溶液が適当であるか、またどれくらい時間をかければよいかについて吟味した。

Table 3 はシイタケより抽出した例であるが RNase, PDase, PMase の何れを抽出するためにも、蒸留水が適当とみとめられた。マッシュルームの場合もほぼ同様な結果が得られた。

Table 4, 5 はそれぞれマッシュルーム、シ

Table 3. The enzyme activities extracted with various solutions from Shii-take.

	Extraction solutions	Activity (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
RNase	Water	2,391	84.1	28
	0.2M Tris buffer (pH 7)	1,184	60.1	20
	0.2% NaCl	1,187	74.0	16
	0.2% Sucrose	911	89.4	10
	0.2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,287	41.5	31
PDase	Water	2,224	84.1	26
	0.2M Tris buffer (pH 7)	827	60.1	14
	0.2% NaCl	627	74.0	8
	0.2% Sucrose	1,090	89.4	12
	0.2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	12	41.5	0
PMase	Water	75,754	84.1	901
	0.2M Tris buffer (pH 7)	52,170	60.1	867
	0.2% NaCl	54,435	74.0	735
	0.2% Sucrose	12,314	89.4	138
	0.2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,346	41.5	129

Table 4. Effect of extraction time on the enzyme activities in mushroom extracts.

	Extraction time (hr)	Activity (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
RNase	0*	257	42.6	6
	0.5	292	47.5	6
	2	330	44.0	8
	4	310	45.0	7
	PDase	0*	1,725	42.6
0.5		1,959	47.5	40
2		1,848	44.0	42
4		1,375	45.0	31
PMase		0*	61,800	42.6
	0.5	28,021	47.5	590
	2	14,430	44.0	327
	4	6,100	45.0	136

\* The homogenate was centrifuged immediately after homogenation.

Table 5. Effect of retention time from homogenation to centrifugation on the enzyme activities extracted from Shii-take.

	Retention time (hr)	Activity (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
RNase	1	2,391	84.1	28
	2	1,483	40.5	37
	4	3,690	59.2	62
	6	2,664	54.3	49
	18	2,368	79.3	30
	PDase	1	2,224	84.1
2		1,068	40.5	26
4		1,870	59.2	32
6		1,144	54.3	21
18		2,283	79.3	29
PMase		1	75,754	84.1
	2	41,038	40.5	1,012
	4	93,732	59.2	1,723
	6	98,400	54.3	1,662
	18	142,440	79.3	1,795

イタケについて抽出時間の影響をしらべたものである。5°Cの冷室で、きのこを蒸溜水と共にホモジナイズし、そのまま保持し、一定時間後に遠心分離して上澄液を粗酵素液とし活性を測定した。マッシュルームでは30分以上経過すると、PMaseが直後の約1/3に低下してしまうので、マッシュルームではホモジナイズした直後に遠心分離して、粗酵素液を取ることが望ましい。シイタケではこのようなPMaseの低下はみとめられず、むしろ時間を経るにともなって活性が高くなるので、4時間までは時間をかけて抽出することが望ましい。

子実体において、傘の部分と足の部分とで、酵素系の活性が異なるか否かについて吟味した。マッシュルーム、シイタケについて、それぞれの部分を蒸溜水ととせにホモジナイズし、マッシュルームではただちに遠心分離し、シイタケでは5°Cで4時間保持した後に遠心分離した。

Table 6, 7 に示すように、マッシュルーム、シイタケともに RNase, PDase 活性では傘と足との差はほとんどなかった。PMase 活性について、足の部分の活性はマッシュルームで傘の部分の約1/9に過ぎず、シイタケで約1/3に過ぎなかった。本報では爾後核酸分解酵素系は傘の部分だけから抽出することにした。

Table 6. Comparison of the activities of nucleic acid degrading enzymes in caps and stems of mushrooms.

	Sample	Activity (unit)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
RNase	Caps	1,804	256.6	7
	Stems	187	30.8	6
PDase	Caps	9,831	256.6	38
	Stems	1,266	30.8	41
PMase	Caps	473,550	256.6	1,845
	Stems	7,313	30.8	237

Table 7. Comparison of the activities of nucleic acid degrading enzyme in caps and stems of Shii-take.

	Sample	Activity (unit)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
RNase	Caps	2,200	123.2	18
	Stems	345	30.9	10
PDase	Caps	858	123.2	7
	Stems	172	30.9	6
PMase	Caps	58,575	123.2	470
	Stems	4,644	30.9	150

Table 8. Change in enzyme activities during storage of mushrooms at various temperatures.

	Storage	Activity (unit)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
RNase	Fresh, 0hr	257	42.6	6
	25°C, 24hr	303	41.8	7
	25°C, 48hr	324	46.1	7
	5°C, 48hr	341	42.3	8
PDase	Fresh, 0hr	1,725	42.6	40
	25°C, 24hr	1,519	41.8	36
	25°C, 48hr	1,856	46.1	40
	5°C, 48hr	1,650	42.3	39
PMase	Fresh, 0hr	61,800	42.6	1,451
	25°C, 24hr	52,920	41.8	1,266
	25°C, 48hr	63,720	46.1	1,382
	5°C, 48hr	54,780	42.3	1,295

### 3. 生きのこ貯蔵中の核酸分解酵素系の消長

私達<sup>7)</sup>はマッシュルームの冷凍貯蔵中の酵素系の消長を6ヶ月間にわたって観察し、それらの活性は凍蔵中に徐々に低下することを見出した。

生きのこ、殊にマッシュルームの保貯期間はきわめて短いことにかんがみ、本報では常温として25°C、48時間までの貯蔵における酵素系の消長をしらべた。これはきのこをγ線照射した後貯蔵する場合の未照射対照値ともなるのである。

Table 8 に示すように 25°C、48 時間までは

RNase, PDase, PMase 活性それぞれほとんど変化はみられなかった。なお 5°C で貯蔵する場合はもちろんほとんど消長はなかった。

#### 4. $\gamma$ 線照射における酸酵分解酵素系の安定性

酵素活性の安定性をしらべるにあたって、 $\gamma$ 線を生きのこよりあらかじめ抽出した粗酵素液に照射した場合の残存活性と、生きのこそのものに照射した後に生きのこから抽出された酵素液の活性とについて吟味した。

前者の場合、前述の抽出条件によりマッシュルーム、シイタケより粗酵素液を抽出し、ガラスアンプルに封入し、それぞれ  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  rad を照射した。照射時間中 5°C に冷蔵した未照射試料を対照として、それらの RNase, PDase, PMase 諸活性を測定した。

Fig. 2, 3 はマッシュルームの場合である。Pasteurization を目的とする場合の線量、 $5 \times 10^5$  rad では3種の酵素活性とも大部分が残存しているが、完全殺菌線量  $5 \times 10^6$  rad を照射した場合は、残存活性は多くの場合40%以下であり、かなり破壊されることが認められた。3種の酵素活性の安定性を相互に比較しても、明らかな優劣は認められなかった。

シイタケの場合は Fig. 4, 5 に示すようである。マッシュルームと同様に  $5 \times 10^5$  rad では諸活性がかなり残存しているが、 $5 \times 10^6$  rad では残存率は多くの場合40%以下であった。

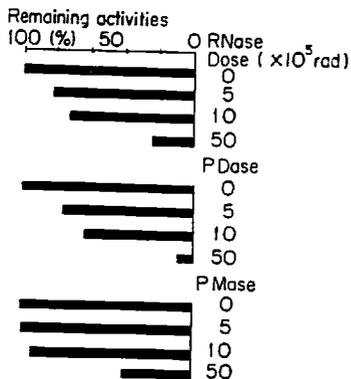


Fig. 2. Effect of  $\gamma$ -ray irradiation on the activities of mushroom enzymes.

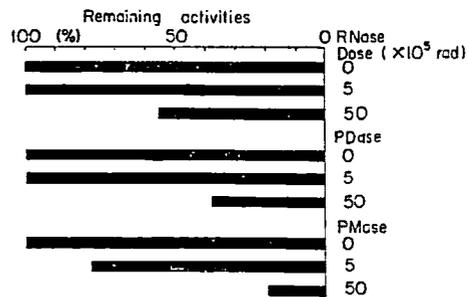


Fig. 3. Effect of  $\gamma$ -ray irradiation on the activities of mushroom enzymes.

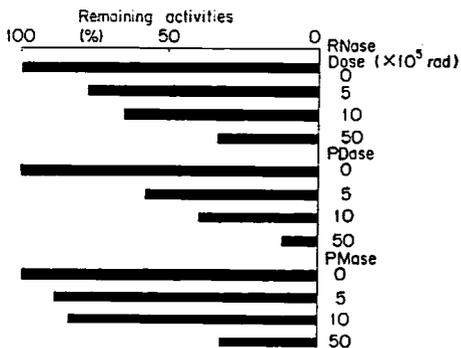


Fig. 4. Effect of  $\gamma$ -ray irradiation on the activities of shii-take enzymes.

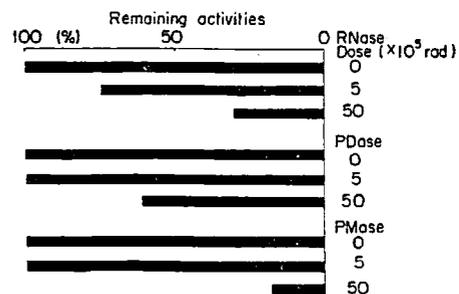


Fig. 5. Effect of  $\gamma$ -ray irradiation on the activities of Shii-take enzymes.

酵素系をあらかじめ抽出して照射した場合と、きのこのままで照射した場合を比較すると、PDase 活性については、前者の場合は後者に比べて活性がかなり低下しているのが認められた。RNase, PMase については著しい差違は認められなかった。

## 考 察

マッシュルームの保貯性延長のために適当な $\gamma$ 線量とみなされている<sup>1,2)</sup>、 $5 \times 10^5$  rad を照射した場合は、ATP、ADP および 5'-ヌクレオチド量にはほとんど変化はなかった。5'-ヌクレオチドは重要な呈味成分であるが、マッシュルーム中の通常の含量<sup>5)</sup> と比べても、呈味性には影響はないと考えられる。Guardia ら<sup>20)</sup> は魚肉に対して  $1.0 \times 10^6$  rad 以下の照射ではヌクレオシド、ヌクレオチド含量には影響がないことを述べている。核酸成分の安定性は、水溶液において線量の増加とともに低下することが知られている<sup>6,16)</sup>が、きのこ内においても完全殺菌線量まで線量を上げると、ATP は痕跡量まで破壊された。

$\gamma$ 線照射によって ATP が破壊されたが、これがどんな分解経路をたどるかについては今後の検討にまたねばならない。私達はマッシュルームなどの煮熟<sup>11)</sup>、冷凍解凍<sup>7)</sup>、凍結乾燥の水戻し<sup>8)</sup>に際して、ATP から AMP をへて塩基に至る経路について記述した。

マッシュルーム、シイタケの核酸分解酵素系は  $25^\circ\text{C}$ 、 $5^\circ\text{C}$  の貯蔵中は安定であるが、 $5 \times 10^6$  rad の照射によってかなり活性が低下した。しかし pasteurization を目的とする程度の線量ではほとんど分解されないの、その後の保貯期間にも残存の割合に応じて作用する可能性がある。English sole (ヒラメの1種) に対する低線量照射において、nucleosidase, nucleotidase は比較的安定で、その後の保貯期間に作用し得ることが報告されている<sup>20)</sup>。

きのこの PDase 活性は、きのこ内で照射された時よりも、あらかじめ抽出されて酵素液の形で照射された時の方が不安定であった。共存する食品成分の影響が考えられるが、今後の検討にまつところが多い。

## 要 約

マッシュルーム及び生シイタケに $\gamma$ 線を照射し、ヌクレオチドおよび核酸分解酵素系の活性に対する影響をしらべた。きのこより酵素系を抽出するには、 $5^\circ\text{C}$  で水と共にホモジナイズすること、傘の部分より抽出することが適当とみとめられた。

マッシュルームの場合、pasteurization 用の線量  $5 \times 10^5$  rad ではヌクレオチド組成および核酸分解酵素系の活性にはあまり影響はなかった。両きのことも、 $5 \times 10^6$  rad の照射では ATP が著しく減少した。また酵素系はかなり破壊され、残存率は多くの場合40%以下であった。

終りに臨み、御指導、御校閲を賜った大阪大学寺本名誉教授、芝崎教授並びに東洋食品工業短期大学志賀学長に深謝致します。なお、 $\gamma$ 線照射して頂いた住友化学工業株式会社宝塚放射中央研究所並びに核酸試料その他御配慮を頂いた武田薬品工業株式会社の皆様方に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Campbell, J. D., Stothers, S., Vaisey, M., Berck, B. : *J. Food Sci.*, 33, 540 (1968).
- 2) Gill, W. J., Nicholas, R. C., Markakis, P. : *Food Technol.*, 23, 385 (1969).
- 3) Bergkvist, R. : *Acta Chem. Scand.*, 12, 1549 (1958).
- 4) 中島・市川・鎌田・藤田 : 農化, 35, 797 (1961).
- 5) 橋田・毛利・志賀・寺本 : 醸酵工誌, 42, 434 (1964).
- 6) 橋田・寺田・毛利 : 醸酵工誌, 投稿予定.
- 7) 毛利・橋田・志賀・寺本 : 醸酵工誌, 45, 362 (1967).
- 8) 毛利・下田・橋田・寺本 : 醸酵工誌, 45, 725 (1967).
- 9) 毛利・橋田・志賀・寺本 : 醸酵工誌, 47, 109 (1969).
- 10) 毛利・橋田・志賀・寺本 : 醸酵工誌, 47, 114 (1969).
- 11) Teramoto, S., Hashida, W., Mouri, T., Shiga, I. : *Technol. Rep. Osaka Univ.*, 18, 247 (1968).
- 12) Wacker, J. : *Progress in Nucleic Acid Research* (Davidson, J. N., Cohn, W. E.), Vol. I, 369, Academic Press, New York, London (1963).
- 13) Weiss, J. J. : *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular* (Davidson, J. N., Cohn, W. E.), Vol. III, 103, Academic Press, New York, London (1964).
- 14) Shugar, D. : *The Nucleic Acids* (Chargaff, E., Davidson, J. N.), Vol. III, 39, Academic Press, New York, London (1960).
- 15) Drake, M. P., Giffey, J. W. : PB 151493, *Radiation Preservation of Food* (U. S. Army Quartermaster Corps.), 133, U. S. Dept. of Commerce, Washington (1957).
- 16) 久保田・渡辺 : 日本水産学会誌, 33, 769 (1967).
- 17) Folin, O., Ciocalteu, V. : *J. Biol. Chem.*, 73, 629 (1927).
- 18) Fiske, C. H., Subbarow, Y. : *J. Biol. Chem.*, 81, 629 (1929).
- 19) 須原・草葉・大村 : 酵素化学シンポジウム, (16), 115 (1965).
- 20) Guardia, E. J., Dollar, A. M. : *J. Food Sci.*, 30, 223 (1965).